吡虫啉对成年意大利蜜蜂脑神经细胞致凋亡作用

吴艳艳，周　婷*，Abebe Jenberie WUBIE，王　强，代平礼，贾慧茹
（中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点实验室，北京 100093）

摘要：【目的】蜜蜂是重要的授粉昆虫，但一直受到新烟碱类杀虫剂（如吡虫啉）的危害，该类杀虫剂主要作用于蜜蜂脑神经细胞。本研究旨在明确吡虫啉对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 脑神经细胞致凋亡作用。【方法】利用亚致死剂量吡虫啉饲喂成年意大利蜜蜂，通过原位末端标记法（TUNEL）检测脑神经细胞的凋亡情况，利用免疫荧光法检测 Caspase-1 激活情况，通过透射电镜观察脑神经细胞的超微结构。【结果】在对选取的脑部 7 个部位进行总体观测后，摄入亚致死剂量的吡虫啉（9.90 ng/蜜蜂）诱导成年意蜂工蜂脑神经细胞凋亡率随时间递增而增加，在处理 9 d 和 12 d 时，处理组与空白对照组差异极显著（$P<0.01$）；Caspase-1 阳性细胞率也随时间递增而增加，在处理 3，6，9 和 12 d 时，处理组与空白对照组差异极显著（$P<0.01$）。凋亡率和 Caspase-1 阳性细胞率均表现出时间效应，且两者成正相关性。超微结构表明凋亡的神经细胞呈现凋亡和自噬双重特征，包括：细胞固缩、染色质浓缩、凋亡小体和自噬体出现；线粒体肿胀，有的被自噬泡包裹后进行线粒体自噬。【结论】本研究从细胞水平证实了亚致死剂量吡虫啉对成年意蜂工蜂脑神经细胞具有致凋亡作用，并且其凋亡途径与 Caspase-1 和细胞自噬有关，这为利用细胞凋亡法评价杀虫剂对非靶标生物的神经毒性提供一定的理论基础。

关键词：意大利蜜蜂；新烟碱类杀虫剂；吡虫啉；细胞凋亡；自噬；Caspase 依赖型；超微结构
中图分类号：Q965.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2014)02-0194-10

Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) brain induced by imidacloprid

WU Yan-Yan, ZHOU Ting*, Abebe Jenberie WUBIE, WANG Qiang, DAI Ping-Li, JIA Hui-Ru (Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract:【Aim】Honeybees are important pollinators, but they are endangered by neonicotinoid insecticides like imidacloprid which mainly impair nerve cells of honeybee brain. Our research aimed to explore the apoptosis in the nerve cells of *Apis mellifera ligustica* brain induced by imidacloprid. 【Methods】Apoptosis was detected in the nerve cells of honeybee brain by TUNEL labeling, cleaved Caspase-1 was detected by immunofluorescence, and the ultrastructure of nerve cells in the brain of adult worker honeybees was observed by transmission electron microscope after treatment with the sublethal dose of imidacloprid (9.90 ng/individual).【Results】An overall observation at seven selected sites of the brain indicated that the apoptotic rate induced by orally administrated imidacloprid at sublethal dose (9.90 ng/individual) increased with treatment time and showed significant differences between the treatment group and the control group at 9 and 12 d after treatment ($P<0.01$). The proportion of Caspase-1 positive cells also increased with the treatment time, and significant differences were observed at 3, 6, 9 and 12 d after treatment ($P<0.01$). The apoptotic rate and the proportion of Caspase-1 positive cells changed in a time-dependent manner, and both showed a positive correlation. The observed ultrastructure of apoptotic nerve cells demonstrated important characteristics of apoptosis and autophagy including cell shrinkage, chromatin condensation, presence of apoptotic bodies and autophagosomes, and swollen mitochondria, some of which were enclosed by autophagic vacuoles and mitophagy occurred. 【Conclusion】These findings suggest that at the cellular level, a sublethal dose of imidacloprid can induce nerve cell apoptosis in the brain of adult worker honeybees, and the apoptotic pathway is related to Caspase-1 and autophagy. This study provides a useful theoretical basis for estimating the harm of

基金项目：国家蜂产业技术体系项目（CARS-45-KXJ6）
作者简介：吴艳艳，女，1984 年生，山东潍坊人，博士研究生，研究方向为蜜蜂病理学，E-mail：mifeng9876@163.com
*通讯作者 Corresponding author，E-mail：ztapis@263.net
收稿日期 Received：2013-12-23；接受日期 Accepted：2014-02-07

pesticides on non-target organisms.
Key words: *Apis mellifera ligustica*; neonicotinoid; imidacloprid; apoptosis; autophagy; Caspase-dependent type; ultrastructure

蜜蜂作为自然界重要的授粉昆虫却受到诸多杀虫剂的侵害。目前，绝大部分杀虫剂属于神经毒剂，其中新烟碱类杀虫剂被认定为是导致全球范围蜂群崩溃失调（colony collapse disorder，CCD）现象的主要因素之一（Bacandritsos *et al.*，2010；Girolami *et al.*，2011；Yang *et al.*，2012；Laurino *et al.*，2013）；其代表品种为吡虫啉，它们是昆虫神经细胞的后突触烟碱乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptors，nAChRs）的激动剂，其杀虫机制为通过阻断昆虫中枢神经系统的正常传导使其出现麻痹甚至死亡现象（Raymond-Delpech *et al.*，2005）；被广泛用作种衣剂，可随植物生长扩散到植物各个组织，包括花粉和花蜜，因而在环境中蜜蜂能够接触到的吡虫啉通常为亚致死剂量，且引起蜜蜂慢性中毒（Cresswell，2011；Krupke *et al.*，2012；Stokstad，2012；Hatjina *et al.*，2013）。以往研究多集中在吡虫啉对成年蜜蜂的急性致死率的测定；研究方法为 LD_{50}（或 LC_{50}）以及幼虫封盖率、化蛹率和羽化率等指标的测定（Ladurner *et al.*，2005；Yang *et al.*，2012）。

细胞凋亡（apoptosis），又称Ⅰ型程序性细胞死亡（programmed cell death I，PCD I），是指机体正常生理状况下细胞自主有序地死亡，一旦该程序受到影响，机体通常会出现各种病理变化，因而通过检测细胞凋亡情况可以获知细胞受损害的程度。TUNEL 法（terminal deoxynueleotiodyl transferase mediated dUTP nick and end labeling，原位末端标记法）可对凋亡细胞染色体 DNA 断裂后出现的 3′-OH 粘性末端进行检测；另外，Caspases 家族（cysteine aspartic acid specific protease family，天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族）的激活是细胞凋亡的典型特征。细胞凋亡技术在蜜蜂领域主要应用于蜜蜂幼虫、蛹和成虫的发育研究，包括对其唾液腺、中肠和卵巢等部位细胞凋亡情况的研究（Silva-Zacarin *et al.*，2008；Ward *et al.*，2008），也有报道指出多种杀虫剂（包括吡虫啉）对蜜蜂幼虫中肠细胞凋亡具有显著影响（Gregorc and Ellis，2011）。然而，吡虫啉作用靶标位置为昆虫神经系统，因而有关吡虫啉对蜜蜂脑神经细胞影响的研究更有针对性。另外，以往研究多采用石蜡切片技术，但冰冻切片更利于保持抗原活性；在切片厚度相同即细胞的清晰度相近时，冰冻切片使细胞状态更接近真实情况（Renshaw，2006）。

本研究以吡虫啉为供试杀虫剂，成年意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spin. 工蜂为实验对象，冰冻切片为载体，利用 TUNEL 法和 Caspase-3 免疫荧光法检测蜜蜂脑神经细胞的凋亡和 Caspase-1 激活情况，并在超微水平观测凋亡细胞形态变化，在细胞水平探求新烟碱类杀虫剂对蜜蜂的影响，为利用细胞凋亡法建立杀虫剂对蜜蜂毒性的评价体系提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫及饲养

实验所用意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica*（简称意蜂）工蜂采自北京市香山地区本实验室蜂场（40.20°N，116.12°E）。在蜂场中随机选取来自不同蜂群的具有正在出房蜜蜂的巢脾若干张，放置于气候培养箱（RXZ-380C，宁波江南）内培养（30℃，相对湿度 70%，黑暗），8～12 h 内将足够数量的刚羽化出房的工蜂装入蜂笼（长×宽×高 = 10 cm×7 cm×8 cm），笼内放入一次性食槽，分别装有花粉 0.5 g、50% 糖水（w/v）2 000 μL 和无菌蒸馏水 300 μL，正常饲喂 7 d（Ramirez-Romero *et al.*，2008）。

1.2　药物处理

从第 8 天开始饲喂特定剂量药物糖水，吡虫啉浓度为 LC_{10} = 19.80 mg/L（宋怀磊，2011），每天每头饲喂 0.5 μL。将 99.99% 吡虫啉（37894，Sigma）溶于丙酮，与 50% 糖水（w/v）配制为相应浓度药液；空白对照组饲喂含丙酮（0.03%）的糖水，待用尽后均饲喂无药物糖水（Decourtye *et al.*，2003）。每笼 60 头蜜蜂，每个处理设置 3 组重复，分别在饲喂 0，3，6，9 和 12 d 取样，其中在正常饲喂 7 d 后，饲喂药物前取样，此时间记作 0 d；每个重复取样 3 头。

1.3　神经细胞和神经胶质细胞的区分

实验仅对神经细胞进行计数，需区分神经细胞和神经胶质细胞。将取样蜜蜂迅速置于冰上 30 s，在预冷的生理盐水内剥离头壳和王浆腺，并小心去

除包被在脑组织外的膜，将剥离干净的脑组织迅速置于4%多聚甲醛溶液中，4℃固定12～16 h。常规方法制备石蜡切片，对蜜蜂脑组织进行水平连续切片，切片厚度4 μm，用苏木精-伊红染色，显微镜(Primo star，ZEISS)观察拍照。结果判定：神经细胞为分布在神经纤维束周边，细胞染色均匀且呈淡蓝色，近似圆形或椭圆形，排布规律，位置集中，大小均一；神经胶质细胞为分布在神经纤维束内或外部，染色致密且呈深蓝色，形状为不规则多边形，排布杂乱。为便于比较，用于后续TUNEL法、Caspase-3免疫荧光法和区分细胞类型的切片为蜜蜂脑组织相同位置的连续切片。

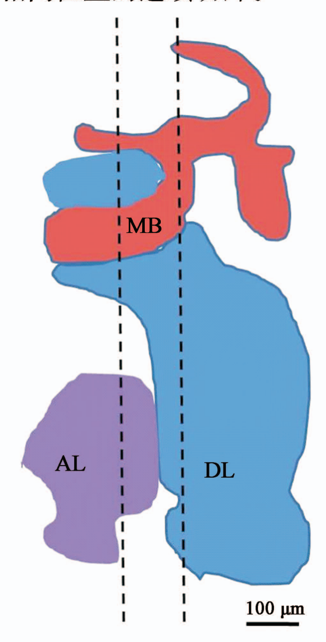


图1 意大利蜜蜂脑部侧面观示意图

Fig. 1 Schematic representation of brain of *Apis mellifera ligustica*

AL：嗅叶 Olfactory lobe；DL：后脑叶 Dorsal lobe；MB：蕈状体 Mushroom bodies.

1.4 细胞计数部位的选取

实验中细胞计数均以冰冻切片为载体。将固定后的脑组织在冷冻切片机内(CM1950，Leica)进行4 μm连续切片，选取具有完整的2侧复眼和2对蕈状体的切片，另外选取具有嗅叶的切片。4%多聚甲醛溶液室温固定10 min，PBS洗涤3次，每次5 min；Hoechst 33258染液(C0003，碧云天)室温染色5 min，PBS洗涤2次，滴加抗荧光淬灭剂后加盖盖玻片，荧光显微镜(Primo star，Zeiss)观察拍照。图1所示2个横切面观察脑部结构与神经细胞分布规律，用于选取后续实验观测与细胞计数的部位。选择标准：计数区域位于脑部主要功能区内部或周边，区域内神经细胞大小均一，排列规律，分布集中，细胞轮廓清晰，便于计数。

1.5 TUNEL法检测细胞凋亡率

首先对冰冻切片进行TUNEL法荧光染色用于指示凋亡细胞，再经Hoechst 33258复染，用于选定区域内总细胞计数。切片于4%多聚甲醛溶液内室温固定15 min，0.1 mol/L PBS洗涤3次，每次5 min。优化后TUNEL步骤为：蛋白酶K(20 μg/μL) 25℃消化5 min，PBS洗涤3次；新鲜配置的TUNEL反应液(Cat. No. 11684817910，Roche)，37℃避光孵育60 min，PBS洗涤3次。阳性对照滴加DNase I(10 U/μL，D2210，TaKaRa)，30℃孵育10 min；阴性对照滴加无TDT酶的缓冲液，其他条件与处理组一致。Hoechst 33258复染及封片见1.4节。结果判定：蓝色荧光指示总细胞，绿色荧光指示TUNEL阳性细胞，两者均为细胞核染色。每个选定部位观测100个细胞，对每个半脑选定的部位的数据进行加和并计算总凋亡率。

1.6 免疫荧光法检测Caspase-1阳性细胞率

对冰冻切片进行抗原修复，10 mmol/L柠檬酸钠(pH 6.0) 95℃孵育20 min，4%多聚甲醛室温固定15 min，PBS洗涤3次；一抗孵育，兔抗激活型Caspase-3单克隆抗体(AC033，碧云天)25℃孵育60 min，PBS洗涤3次；二抗孵育，抗兔FITC(P0186，碧云天)25℃孵育60 min，PBS洗涤3次；Hoechst 33258复染及封片见1.4节。结果判定：绿色荧光指示阳性细胞，蓝色荧光指示总细胞。计数方法见1.5节。

1.7 透射电镜观察凋亡细胞形态学变化

将蜜蜂脑组织解剖为3部分，2个对称的视叶和剩余中间部位；分别加入2.5%戊二醛500 μL，4℃固定12 h。样品脱水，环氧树脂包埋，按透射电镜常规制样方法制备超薄切片，透射电镜(7500，HITACHI)观察并拍照。

1.8 数据统计与分析

细胞凋亡率和Caspase-1阳性细胞率的数据分析，实验数据以平均数±标准误差(*SE*)表示；应用SPSS 19.0统计学软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)，Tukey氏HSD法多重比较分析差异显著性。细胞凋亡百分率和Caspase-1阳性细胞率的时间效应以及两者相关性分析，通过简单散点图检验线性关系，对符合线性关系的进行双变量和Spearman法分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 成年意蜂工蜂脑部神经细胞分布与 7 个细胞计数部位

通过对细胞核进行 Hoechst 33258 染色，确定了神经细胞的分布情况(图 2：A)。在神经纤维体外侧，神经细胞球体(globuli cell，简称细胞体，文中指神经细胞)多规律排列，细胞核大小均一，近椭圆型；各类神经胶质细胞在纤维体内部，呈不规则多边形，大小不均一。图 2(A)中可见意蜂脑部主要结构部位包括视神经节层(lamina)、外神经交叉(external chiasma)、视髓层(medulla)、内神经交叉(internal chiasma)、视叶(lobula)、蕈状体(mushroom bodies)、中心体(central body)、前侧脑叶(protocerebral lobes)、食道下神经节(suboesophagyl ganglion)和触角叶[antennal lobe，又称嗅叶(olfactory lobe)]等部位。在上述部位内部或之间分布着大量的神经细胞，根据意蜂脑组织部位的不同以及神经细胞分布规律选定下述 7 个部

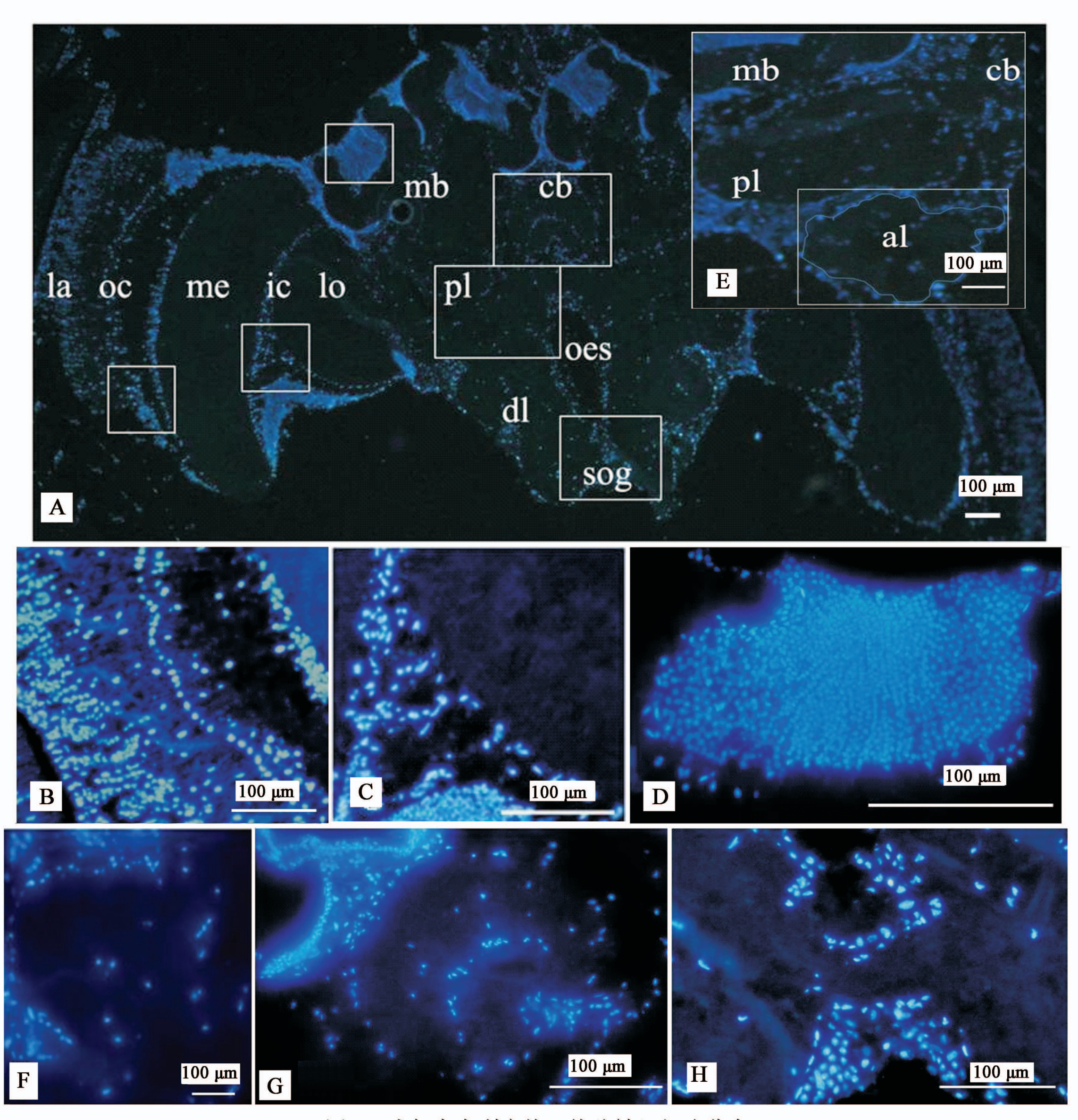


图 2　成年意大利蜜蜂工蜂脑神经细胞分布

Fig. 2　Distribution of nerve cells in brain of adult worker honeybee (*Apis mellifera ligustica*)

A：脑结构示意图 Schematic representation of brain. la：视神经节层 Lamina；oc：外神经交叉 External chiasma；me：视髓层 Medulla；ic：内神经交叉 Internal chiasma；lo：视叶 Lobula；mb：蕈状体 Mushroom bodies；pl：前侧脑叶 Protocerebral lobes；cb：中心体 Central body；dl：后脑叶 Dorsal lobe；oes：食道 Esophagus；sog：食道下神经节 Suboesophagyl ganglion；al：触角叶或嗅叶 Antennal lobe or olfactory lobe. B－H：分别为 oc，ic，mb，al，pl，cb 和 sog 选定部位 Selected sites oc，ic，mb，al，pl，cb，and sog，respectively.

位进行细胞计数(图2：A，从左至右)：外神经交叉区神经细胞(oc 下侧方框)、内神经交叉区神经细胞(ic 下侧方框)、蕈状体冠上端的联系神经细胞(Kenyon cells，也称内源性神经细胞)(mb 左上方方框)、前侧脑叶各个神经纤维束间的神经细胞(pl 处方框)、中央体神经纤维束外侧神经细胞(cb 处方框)和食道下神经节周围神经细胞(sog 处方框)。由于图2(A)所示切片未包含嗅叶部分，图2(E)可用于嗅叶内部和周围神经细胞计数(al 处方框)。7 个计数部位局部放大图见图2(B ~ H)。

2.2　吡虫啉处理后意大利蜜蜂脑神经细胞凋亡率变化情况

通过 Hosech 33285(图3：A)和 TUNEL 法荧光染色(图3：B)，并经苏木素-伊红染色排除神经胶质细胞(图3：D)，可确定计数部位内总细胞数和凋亡细胞数。对选定的脑部7个部位进行总凋亡率统计，得知经口摄入亚致死剂量吡虫啉(9.90 ng/蜜蜂)诱导意蜂脑神经细胞凋亡率随饲喂时间的递增逐渐增加，其中饲喂9 d 和 12 d 时，吡虫啉处理组与空白对照组存在极显著差异(图4)，处理 12 d 时凋亡率最高(45.7% ± 25.48%)，为空白对照组 6.81 倍；空白对照随时间递增无显著性差异(图3：C)。同时，在吡虫啉剂量为 9.90 ng/蜜蜂时，神经细胞凋亡率表现出时间效应($r = 0.976$，$P < 0.05$)。

2.3　吡虫啉处理后意大利蜜蜂脑神经细胞 Caspase-1 阳性细胞率

通过 Hoeschst 33285 细胞核染色(图5：A)和 Caspase-1 阳性细胞(图5：B)对比，并排除神经胶质细胞，发现不同部位凋亡率不同，其中内神经交叉神经细胞凋亡率(9 d)约为 90% (图5：B)，而嗅叶周围约为 30% (图5：E)。对选定的脑部7个部位计算总凋亡率，得知在处理3，6，9 和 12 d 时，经口摄入亚致死剂量吡虫啉(9.90 ng/蜜蜂)诱导的意蜂脑部神经细胞 Caspase-1 激活阳性细胞率之间具有极显著性差异(图6)，其中处理 12 d 时最高(90.05% ± 2.36%)，为空白对照组 12.44 倍；空白对照组随时间递增无显著性差异(图5：C)。在吡虫啉剂量为 9.90 ng/蜜蜂时，Caspase-1 激活阳性细胞率表现出时间效应($r = 0.945$，$P < 0.05$)。同时，通过相关性分析得知神经细胞凋亡率与Caspase-1

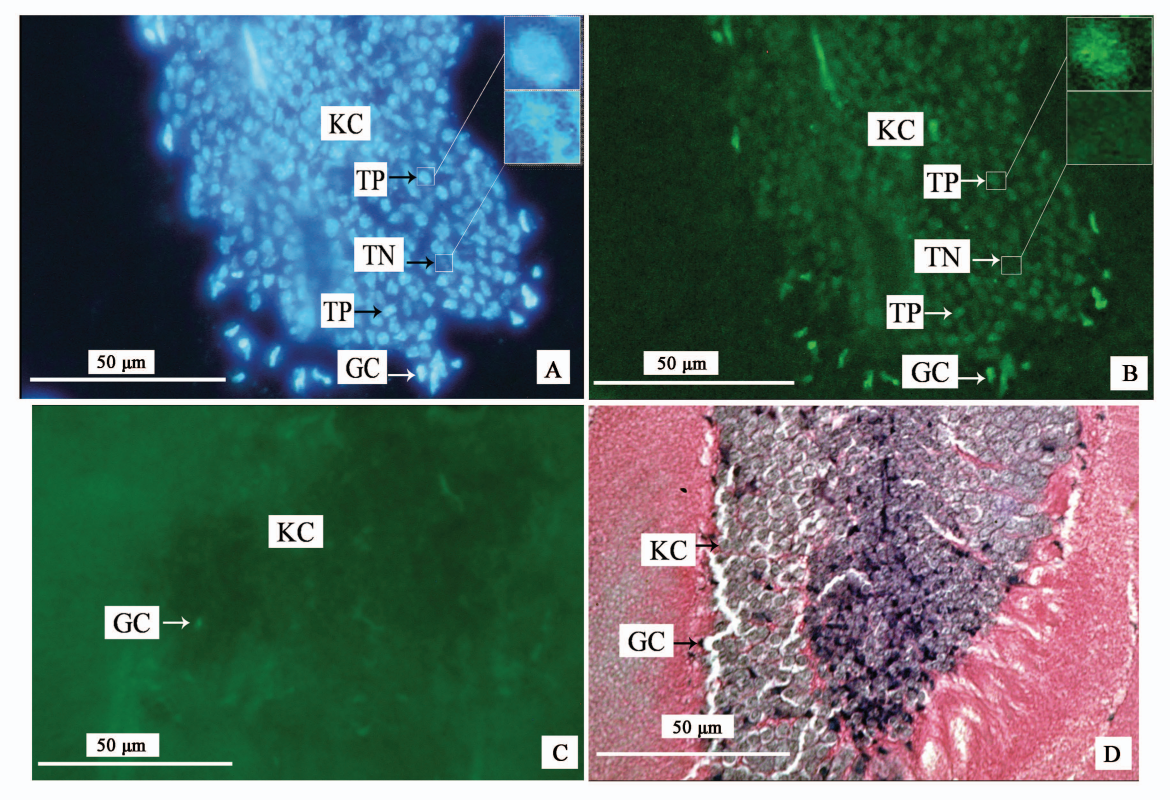


图3　吡虫啉处理9 d 后成年意大利蜜蜂联系神经细胞的凋亡情况

Fig. 3　Apoptosis of the Kenyon cells of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) at 9 d after treatment with imidacloprid

A：处理组 Hosech 33285 染色 Hosech 33285 staining of the treatment group；B：处理组 TUNEL 标记 TUNEL labeling of the treatment group；C：空白对照组 TUNEL 标记 TUNEL labeling of the blank control group；D：苏木素-伊红染色 Hematoxylin and Eosin staining. KC：联系神经细胞 Kenyon cells；TP：TUNEL 阳性细胞 TUNEL positive cells；TN：TUNEL 阴性细胞 TUNEL negative cells；GC：神经胶质细胞 Glial cells.

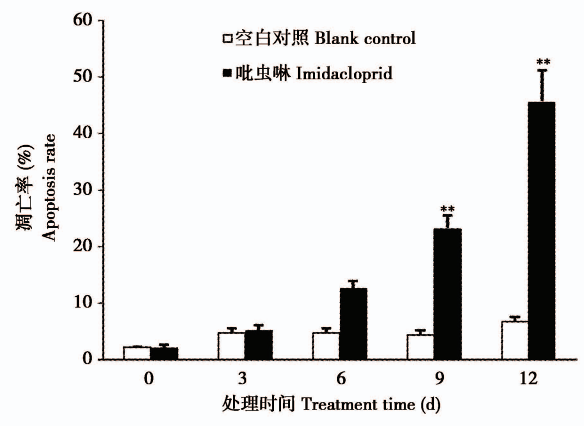


图 4 吡虫啉处理后成年意大利蜜蜂脑神经细胞的凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rate of nerve cells in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) after treatment with imidacloprid

图中每个处理 3 组重复，数据为平均值 ± 标准误；柱上双星号表示处理与对照间差异极显著($P<0.01$)(单因素方差分析)；图 6 同。Data of 3 replicates in the figure are denoted as mean ± *SE*; double asterisks above bars indicate extremely significant difference between the treatment and the blank control ($P<0.01$) (one-way ANOVA). The same for Fig. 6.

激活阳性细胞率正相关($r=0.897$, $P<0.05$)。

2.4 吡虫啉处理后意蜂脑神经细胞超微结构变化

在经口摄入亚致死剂量吡虫啉(9.90 ng/蜜蜂)处理 9 d 后，通过对意蜂视叶和脑组织剩余部分进行透射电镜观测，得知两个部位神经细胞集中的区域均出现相应程度的凋亡现象，而空白对照组极少出现。空白对照组的细胞膜清晰可见，双层膜结构完整，线粒体形状和嵴结构正常；核膜完整，界线清晰，双层膜结构存在，核仁清晰可见(图 7：A)。凋亡的神经细胞呈现细胞固缩，部分膜边界模糊，但仍未破裂(图 7：B)；细胞核固缩，染色质浓缩并具有不同程度边集现象(图 7：B)，核膜界限模糊(图 7：C，E，F)，核孔逐渐清晰(图 7：F)，尚无膜包裹的核降解残片出现；线粒体肿胀，呈现哑铃状和不规则管状，但仍可见稀疏嵴结构(图 7：C)；部分神经细胞粗面内质网空泡状，细胞边缘出现凋亡小体(图 7：D)；自噬体出现(图 7：E，F)，包括线粒体自噬体(图7：E)和自噬泡(图7：F)，且可见

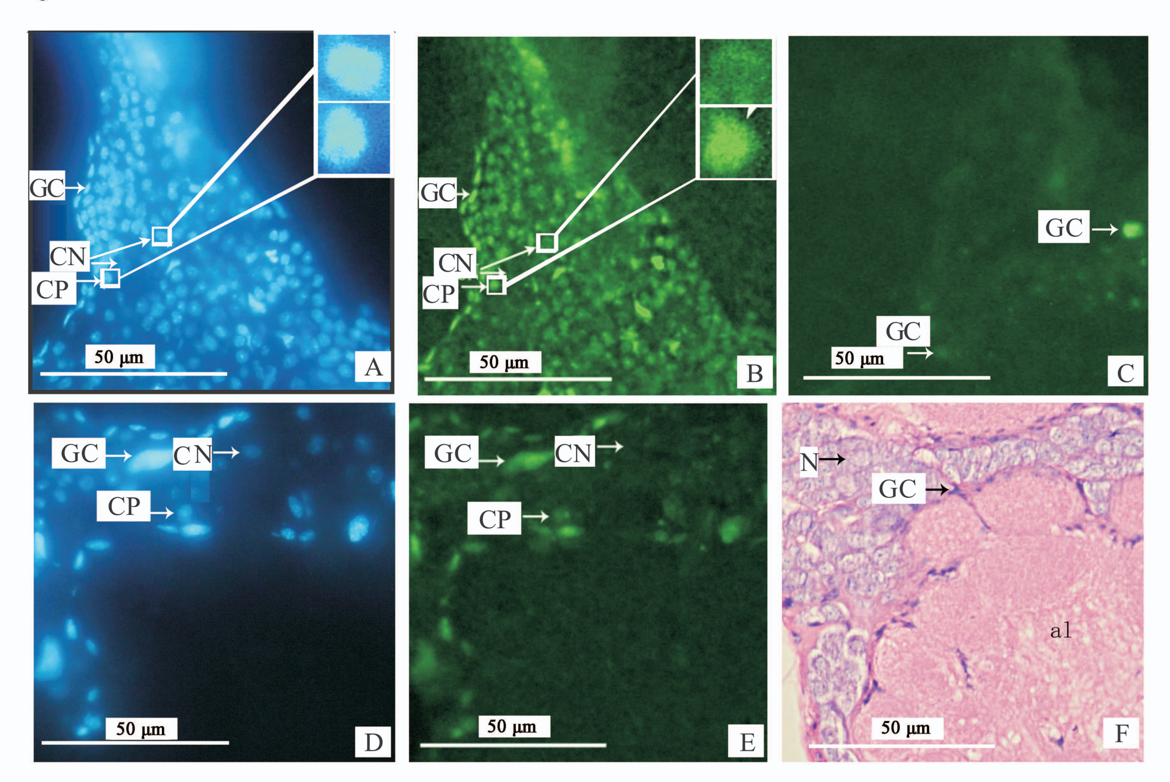


图 5 吡虫啉处理 9 d 后成年意大利蜜蜂脑神经细胞 Caspase-3 的免疫荧光检测

Fig. 5 Apoptosis of nerve cells in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) at 9 d after treatment with imidacloprid detected by Caspase-3 immunofluorescence

A－C：内神经交叉神经细胞 Nerve cells of internal chiasma；D－F：嗅叶神经细胞 Nerve cells of olfactory lobe. A，D：处理组 Hosech 33285 染色 Hosech 33285 staining of the treatment group；B，E：处理组免疫荧光法 Immunofluorescence of the treatment group；C：空白对照组免疫荧光法 Immunofluorescence of the blank control group；D：处理组 Hosech 33285 染色 Hosech 33285 staining of the treatment group；F：苏木素-伊红染色 Hematoxylin and Eosin staining. CP：阳性细胞 Positive cells；CN：阴性细胞 Negative cells；GC：神经胶质细胞 Glial cells. N：神经细胞 Nerve cells；al：嗅叶 Olfactory lobe.

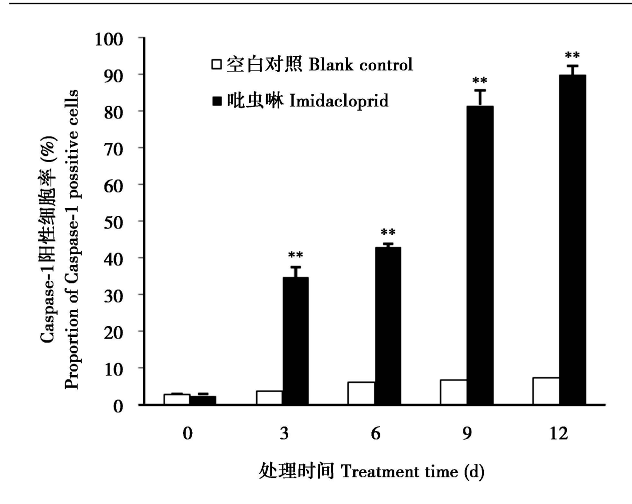


图 6 吡虫啉处理后成年意大利蜜蜂脑神经细胞 Caspase-1 阳性细胞率

Fig. 6 Proportion of Caspase-1 positive nerve cells in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) after treatment with imidacloprid

线粒体与自噬泡两者膜融合阶段(图 7：F)。此外，内神经交叉区和蕈状体边缘部位神经细胞内部组成存在差异，后者(图 7：F)线粒体数量明显多于前者(图 7：B)。

3 讨论与结论

3.1 新烟碱类杀虫剂对成年意蜂的危害

新烟碱类杀虫剂因对昆虫高毒对哺乳动物低毒，目前广泛应用于田间，而同时对非靶标生物存在威胁(de Jong *et al.*, 2008)。使用较广的新烟碱类杀虫剂，包括噻虫嗪(Henry *et al.*, 2012)、啶虫脒(El Hassani *et al.*, 2008)和吡虫啉均对成年意蜂行为(学习、记忆和运动能力)产生不利影响(Ramirez-Romero *et al.*, 2008；Yang *et al.*, 2012)。另外，由于实验条件的差异，即使在杀虫剂和实验对象相同的情况下所获得的 LD_{50} 和相应亚致死剂量仍不同，本研究以本室宋怀磊(2011)获得的吡虫啉实验数据为基础，以 9.90 ng/蜜蜂为测试剂量，结果表明相应剂量吡虫啉能够诱导成年意蜂工蜂脑神经细胞凋亡且存在时间效应，这在细胞水平证实吡虫啉在亚致死剂量时对意蜂具有慢性神经毒性，且推测神经毒性作用导致其行为的改变。

3.2 成年意蜂工蜂脑神经细胞的分布与功能

昆虫脑组织主要由神经细胞和神经纤维束形成各个部分，且各部分的功能随部位各异又相互联系。成年意蜂工蜂脑部由前脑(protocerebrum)、中脑(deutocerebrum)和后脑(tritocerebrum)组成。在脑间部(pars intercerebralis)分布着大量神经细胞，它们随部位不同而具有不同凋亡特性；此外，在特定杀虫剂作用下，意蜂幼虫不同部位(包括唾液腺、卵巢和中肠)和细胞类型(正常细胞和增殖细胞)的细胞凋亡特性不同(Gregorc and Ellis, 2011)；本研究结果也表明在意蜂脑组织不同部位的神经细胞凋亡率不同，且超微结构也显示蕈状体周围和视神经交叉区域的神经细胞的内部构成不同，前者细胞内部线粒体数量明显高于后者，而线粒体是细胞的能量工厂，线粒体越多代表细胞越活跃，据此推测蕈状体较视叶行使的功能更复杂或频繁。同时，表明按脑功能和结构选取特定部位进行总凋亡率计算，较以往随机选取视野的方法更加全面和准确。

同时，成年意蜂脑神经细胞和幼虫体细胞凋亡检测方法不同，前者需通过苏木素-伊红方法区分神经胶质细胞与神经细胞，另外，由于成年意蜂脑神经细胞通常无活跃的增殖现象，因而仅对神经细胞凋亡或者坏死进行观测。

3.3 成年意蜂工蜂脑神经细胞的凋亡和自噬

3.3.1 脑神经细胞的凋亡：作为凋亡效应器的 Caspases 在激活后，主要对凋亡过程中 DNA 裂解和细胞形态的改变起关键作用。意蜂基因组中已知的 Caspases 家族蛋白仅有 Caspase-1 (Protein ID：XP39569-7.2)，编码 298 个氨基酸，并具有保守五肽结构域 QACQG，与人 Caspase-3 (Protein ID：NP004337.2)氨基酸序列一致性为 42%，且均具有 Asp175 酶切位点；这与家蚕 *Bombyx mori* 情况相似，且家蚕 Caspase-1(GenBank 登录号：AF44S494)活性可被 Caspase-3 抑制剂所抑制(Terashima *et al.*, 2000)；另外，在海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞内，Caspase-1 能够与兔抗激活型 Caspase-3 多克隆抗体特异结合(Rhee *et al.*, 2002；Vilaplana *et al.*, 2007；王文祥等, 2011)；据此，本研究利用兔抗激活型 Caspase-3 单克隆抗体进行了免疫荧光染色，结果表明经口摄入亚致死剂量吡虫啉(9.90 ng/头)引起成年意蜂工蜂脑神经细胞内 Caspase-1 激活的阳性细胞率表现出时间效应；在处理 3 d 时即出现显著性差异，早于凋亡出现显著差异的时间(9 d)，因此，Caspase-1 持续作用于凋亡过程的早、中和晚期，而 TUNEL 法检测的 DNA 片段化出现在凋亡晚期；同时，神经细胞凋亡率与 Caspase-1 阳性细胞率成正相关性，由此可见，意蜂脑神经细胞凋亡途径

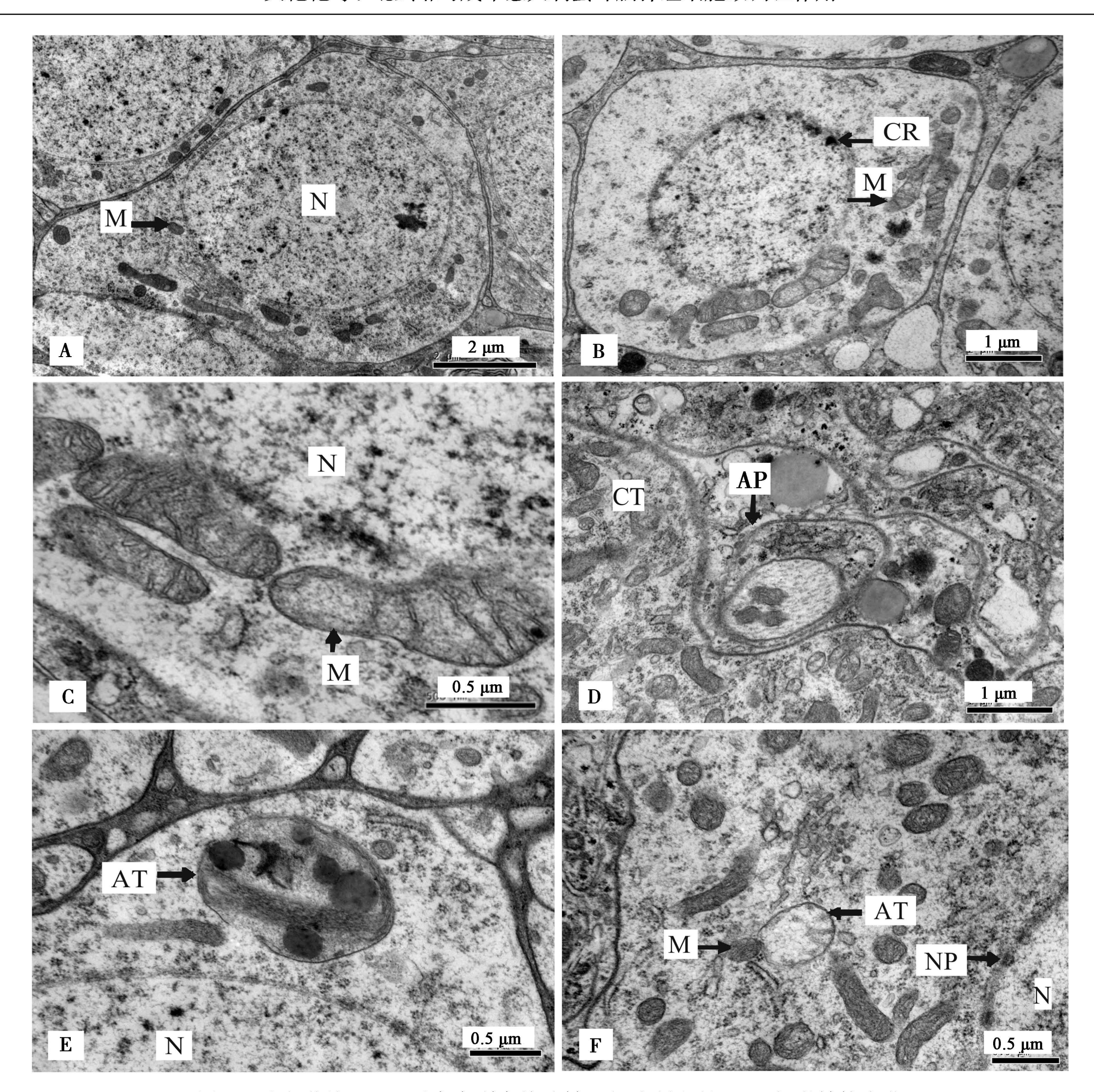


图 7　吡虫啉处理 9 d 后意大利蜜蜂脑神经细胞凋亡的 TEM 超微结构变化

Fig. 7　TEM ultrastructure changes of apoptotic nerve cells in the brain of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) at 9 d after treatment with imidacloprid

A：视叶神经细胞空白对照 Nerve cells in internal chiasma of the blank control；B，C，E：内神经交叉细胞处理组 Internal chiasma in the treatment group；D，F：蕈状体外侧神经细胞处理组 Nerve cells outside the mushroom bodies in the treatment group. N：细胞核 Nuclei；M：线粒体 Mitochondria；CR：染色质 Chromatin；CT：细胞质 Cytoplasm；AP：凋亡小体 Apoptotic bodies；AT：自噬泡 Autophagic vacuole；NP：核孔 Nucleopore.

与 Caspase-1 的激活相关；另外，透射电镜观测到的凋亡特征包括细胞核固缩，染色质呈点状分布且具有不同程度边集现象，凋亡小体出现；因此，在细胞水平和超微结构均证实亚致死剂量吡虫啉能够诱导成年意蜂工蜂脑神经细胞凋亡，且与 Caspase-1 依赖型凋亡相关。

3.3.2　脑神经细胞的自噬：本研究结果还表明，经亚致死剂量吡虫啉处理后成年意蜂工蜂脑神经细胞具有 Caspase-1 依赖型凋亡和自噬的双重特征。自噬又称为Ⅱ型程序性细胞死亡，在某些情况下细胞凋亡与自噬可交替或同时发生（Lockshin and Zakeri，2004）。意蜂化蛹过程中其唾液腺细胞凋亡和自噬过程重叠（Zacarin，2007），且其自噬特征包括细胞内出现细胞质空泡（cytoplasm vacuolation）、自噬泡（autophagic vacuole）和细胞核降解延迟等，本研究观测结果与其相似，意蜂脑神经细胞发生的自噬包括大自噬（macroautophagy）中线粒体自噬（mitophagy）（Okamoto *et al.*，2009）和自噬泡自噬，

也未见被膜包裹的细胞核碎片；另外，烟草天蛾 *Manduca sexta* 化蛹时跗节牵引肌神经细胞出现自噬现象(Kinch *et al*., 2003)，且细胞呈现大量的自噬体、线粒体固缩和细胞核解体等现象；本研究结果与其不同点为线粒体肿胀，并被自噬泡包裹后形成线粒体自噬体；推测意蜂脑神经细胞中线粒体自噬体和自噬泡的内部物质会在溶酶体的作用下逐渐降解，并最终由其他细胞吞噬进行循环利用，而无线粒体固缩和细胞核解体现象；这也再次证实细胞凋亡和自噬可发生重叠并引起程序性细胞死亡，而两者共同作用所呈现的特征在不同条件下有可能不同。

杀虫剂能否引起昆虫细胞损伤取决于多种因素的影响，其中较为关键的因素为杀虫剂的穿透性、靶标识别力、作用机制和饲喂剂量等。昆虫血淋巴与神经系统之间的膜，能够阻断离子通过，因而杀虫剂的离子化程度越低越利于对膜的穿透性；吡虫啉在生理 pH 值条件下，仅有极少量被质子化(Shimomura *et al*., 2002)，因而极易进入昆虫神经系统。此外，吡虫啉能够自动识别意蜂脑神经细胞内的 nAChRs，并在不同类型神经细胞内充当全部或部分激动剂(Nauen *et al*., 2001)。同时，亚致死剂量吡虫啉对蜜蜂毒性具有剂量效应(Yang *et al*., 2008)。因而，为完善新烟碱类杀虫剂对蜜蜂毒性的评价体系，还需扩大吡虫啉亚致死剂量的测试范围以及进行体外细胞毒性研究。

参考文献(References)

Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F, 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.*, 105(3): 335–340.

Cresswell JE, 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1): 149–157.

de Jong FMW, de Snoo GR, van de Zande JC, 2008. Estimated nationwide effects of pesticide spray drift on terrestrial habitats in the Netherlands. *J. Environ. Manag.*, 86(4): 721–730.

Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue MH, 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.*, 59(3): 269–278.

El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C, 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(4): 653–661.

Girolami V, Marzaro M, Vivan L, Mazzon L, Greatti M, Giorio C, Marton D, Tapparo A, 2011. Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *J. Appl. Entomol.*, 136(1): 17–26.

Gregorc A, Ellis JD, 2011. Cell death localization *in situ* in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic. Biochem. Phys.*, 99(2): 200–207.

Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C, Arnold G, 2013. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, 44: 467–480.

Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348–350.

Kinch G, Hoffman KL, Rodrigues EMR, Zee MC, Weeks JC, 2003. Steroid-triggered programmed cell death of a motoneuron is autophagic and involves structural changes in mitochondria. *J. Comp. Neurol.*, 457(4): 384–403.

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K, 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE*, 7(1): e29268.

Ladurner E, Bosch J, Kemp WP, Maini S, 2005. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* and *Apis mellifera*. *Apidologie*, 36(3): 449–460.

Laurino D, Manino A, Patetta A, Porporato M, 2013. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bull. Insectol.*, 66(1): 119–126.

Lockshin RA, Zakeri Z, 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12): 2405–2419.

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R, 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.*, 57(7): 577–586.

Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y, 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell.*, 17(1): 87–97.

Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, Chaffiol A, Pham-Delègue MH, 2008. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 70(2): 327–333.

Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB, 2005. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci.*, 5(3): 119–133.

Renshaw S, 2006. Immunohistochemistry. Scion Publishing Ltd., Bloxham, UK. 45–46.

Rhee WJ, Kim EJ, Park TH, 2002. Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295(4): 779–783.

Shimomura M, Okuda H, Matsuda K, Komai K, Akamatsu M, Sattelle DB, 2002. Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the α7 nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands. *Brit. J. Pharmacol.*,

137(2): 162 –169.

Silva-Zacarin EC, Taboga SR, Silva de Moraes RLM, 2008. Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera*. *Micron*, 39(2): 117 –127.

Song HL, 2011. Effects of the Sublethal Doses of Deltamethrin and Imidacloprid on *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae). MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [宋怀磊, 2011. 亚致死剂量溴氰菊酯和吡虫啉对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica* L.)的影响. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Stokstad E, 2012. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. *Science*, 335(6076): 1555.

Terashima J, Yasuhara N, Iwami M, Sakurai S, 2000. Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 210(11): 545 –558.

Vilaplana L, Pascual N, Perera N, Bellés X, 2007. Molecular characterization of an inhibitor of apoptosis in the Egyptian armyworm, *Spodoptera littoralis*, and midgut cell death during metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(12): 1241 –1248.

Wang WX, Zhong GH, Hu MY, Huang JF, Ge CC, 2011. Induced apoptosis of camptothecin in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 894 –901. [王文祥, 钟国华, 胡美英, 黄劲飞, 葛萃萃, 2011. 喜树碱诱导的草地贪夜蛾 Sf9 细胞凋亡. 昆虫学报, 54(8): 894 –901]

Ward KN, Coleman JL, Clinnin K, Fahrbach S, Rueppell O, 2008. Age, caste, and behavior determine the replicative activity of intestinal stem cells in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.*, 43(6): 530 –537.

Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW, 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11): e49472.

Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH, 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 101(6): 1743 –1748.

Zacarin EC, 2007. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy*, 3(5): 516 –518.

(责任编辑: 赵利辉)